

BEATRIZ INÊS SIMÕES JANEIRO

**PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA E AVALIAÇÃO DA SUA AÇÃO
ANTIMICROBIANA**

Orientadora: Professora Doutora Marisa Nicolai

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa
2020

BEATRIZ INÊS SIMÕES JANEIRO

**PREPARAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA E AVALIAÇÃO DA SUA AÇÃO
ANTIMICROBIANA**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no dia 22/ 01 2021), perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação n.º: 01/2021, de 01/2021, com a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Profª. Doutora Maria Lídia Palma

Orientador:

Profª. Doutora Marisa Nicolai

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2020

*Sempre aqui estarei para reforçar a nossa
entidade farmacêutica, o nosso rigor e a
nossa missão de olhar para o doente como
a nossa razão de ser.*

Professora Maria Odette Santos Ferreira
2017

Agradecimentos

O ciclo que está prestes a terminar, foi uma viagem longa e esta foi marcada por inúmeros desafios, tristezas, incertezas e alegrias, mas apesar do processo não ter sido de todo fácil existem várias pessoas indispensáveis em cada momento e por essa razão faz todo o sentido as mesmas serem destacadas nesta dissertação.

Em primeiro lugar queria agradecer a Professora Doutora Marisa Nicolai, por ter aceite a orientação nesta dissertação de mestrado. A sua exigência e rigor foram fundamental para o término da mesma, foi um processo longo, mas foi concluído da melhor forma. Em segundo e não menos importante, a Professora Doutora Catarina Reis e a Professora Doutora Patrícia Rijo na unidade curricular de Projeto I e II, por me terem orientado durante o trabalho laboratorial que originou esta dissertação de mestrado.

Durante a supervisão das unidades curriculares, a exigência das mesmas e o conhecimento científico, desenvolveram diversas competências a minha vida futura.

Gostava também de agradecer, a Joana Andrade e a Ana Mota, pelo apoio e conhecimento das mesmas durante este processo. Foram fundamentais, em todos os momentos. Na falta de inspiração, no laboratório, e especialmente na amizade gerada durante todo este processo.

Num nível diferente, quero demonstrar o meu profundo agradecimento aos meus pais, irmã, cunhado, sobrinho e namorado por todo o apoio incondicional e incentivo contínuo durante a elaboração desta dissertação.

Por fim uma menção a todos os meus amigos, que todos a sua maneira estiveram sempre presentes em todos os momentos desta caminhada.

Resumo

O termo "nano" não é novo, pois o uso de nanopartículas remonta aos tempos antigos. A evolução da nanotecnologia permitiu o melhor uso de agentes ativos para cosméticos, diagnóstico e tratamento. É sabido que as nanopartículas oferecem várias vantagens na indústria farmacêutica devido à sua capacidade de administrar medicamentos ou ativos corretamente, promover maior solubilidade e permeação da membrana, aumentar a afinidade pelos recetores e, em alguns casos, diminuir alguns efeitos colaterais adversos.

Mais especificamente, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm sido consideradas agentes antibacterianos interessantes, pois proporcionam maior interação com a membrana celular e fácil penetração celular.

Existem diferentes métodos para produzir nanopartículas que podem ser de cima para baixo e de baixo para cima (denominados *top-down* e de *bottom-up*). No primeiro caso, as AgNPs podem ser sintetizados por métodos físicos, como ablação a laser, decomposição térmica, pirólise por *spray* ultrassônico, evaporação/condensação; e no segundo, as AgNPs são obtidas por materiais e reagentes de nível atômico, por métodos químicos ou biológicos.

Neste trabalho, três tipos de AgNPs foram obtidos por diferentes métodos usando a redução de borohidreto como agente redutor de prata: banho de gelo (método A), solução aquosa aquecida de NaBH₄ (método B) e solução aquecida de AgNO₃ (método C). Os AgNPs foram caracterizados em termos de espectros de absorção, tamanho médio, índice de polidispersividade e carga superficial. Então, a sua atividade biológica contra duas bactérias Gram-positivas *S. aureus* e Gram-negativas *E. coli* foi também avaliada.

De acordo com os resultados obtidos, o método utilizando borohidreto de sódio aquecido apresentou os maiores valores de inibição para *S. aureus* e *E. coli*.

Palavras-chave: Nanopartículas, Prata, AgNPs, antimicrobiano, halos de inibição

Abstract

The term “nano” is not new since the use of nanoparticles remotes to ancient times. The evolution of nanotechnology has enabled the better use of active agents for cosmetics, diagnosis and treatment. It is well known that nanoparticles offer several advantages in the pharmaceutical industry because of their ability to correctly deliver drugs or actives, to promote higher solubility and membrane permeation, to enhance the affinity for receptors and in some cases to decrease some adverse side effects.

More especifically, silver nanoparticles (AgNPs) have been considered interesting antibacterial agents because they provide greater interaction with the cell membrane and easy cell penetration.

There are different methods for producing nanoparticles that can be top-down and bottom-up. In the first case, the AgNPs may be synthesized by physical methods such as laser ablation, thermal decomposition, ultrasonic spray pyrolysis, evaporation/condensation; and in the second, the AgNPs are obtained by atomic level materials and reagents, through chemical or biological methods.

In this work, three types of AgNPs were obtained by different methods using borohydride reduction as reducing agent of silver: ice bath (method A), heated aqueous solution of NaBH₄ (method B) and heated solution of AgNO₃ (method C). AgNPs were characterized in terms of absorption spectra, mean size, polydispersity index and surface charge. Then, their biological activity against two bacteria Gram-positive *S. aureus* and Gram-negative *E. coli*. also evaluated.

According to the results obtained, the method using heated sodium borohydride showed the highest inhibition values for *S. aureus* and *E. coli*.

Keywords: Nanoparticles, Silver, AgNPs, antimicrobial, inhibition zone

Abreviaturas

A/O	Água em óleo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CTAB	Brometo de cetrimónio
DL ₅₀	Dose letal média
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Espécies Reativas de Oxigénio
NPs	Nanopartículas
AgNPs	Nanopartículas de prata
O/A	Óleo em água
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polieterimida
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PVA	Acetato de Polivinilo
PVP	Polivinilpirrolidona
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UV	Ultravioleta

Índice

Resumo.....	5
Abstract.....	6
Abreviaturas.....	7
Índice de Figuras.....	9
Índice de Tabelas	10
1. Introdução	11
2. A prata e a nanotecnologia: enquadramento histórico e utilizações	12
2.1 Elemento químico - a prata.....	12
2.2 A nanotecnologia	13
2.3 Nanopartículas de prata e os seus métodos de síntese	15
2.3.1 <i>Top-down</i> : Métodos físicos.....	16
2.3.2 <i>Bottom-up</i> : Métodos químicos.....	18
2.3.3 <i>Bottom-up</i> : Métodos biológicos.....	21
2.4 Nanotecnologia de prata na microbiologia.....	25
3. Trabalho de Campo	27
3.1 Materiais e métodos	27
3.1.1 Materiais	27
3.1.2 Métodos.....	27
3.1.2.1 Preparação de nanopartículas de prata	27
3.1.2.2 Caraterização das nanopartículas de prata	28
3.1.2.3 Ensaaios <i>in vitro</i>	29
3.2 Resultados.....	30
3.2.1 Caraterização das nanopartículas de prata.....	30
3.2.2 Testes de eficácia <i>in vitro</i> das nanopartículas de prata.....	31
4. Discussão	33
6. Conclusão e Perspetivas futuras.....	35
7. Referências bibliográficas	36

Índice de Figuras

FIGURA 1. ESQUEMA DOS MÉTODOS DE TOP-DOWN E BOTTOM-UP USADOS NA PREPARAÇÃO DE AGNPs	16
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ILUSTRATIVA DA ABLAÇÃO A LASER COM UM FEIXE INCIDENTE E A ABLAÇÃO DA PRATA PARA A FORMAÇÃO DE AGNPs, EXTRAÍDO DE (DE MATTEIS ET AL., 2018).	17
FIGURA 3. REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO ELETROQUÍMICO PARA A PRODUÇÃO DE AGNPs, USANDO UM ÂNODO E CÁTODO DE AG. 1) DEPOSIÇÃO DE PRATA OXIDADA NO ESTADO DE OXIDAÇÃO +1; 2) FORMAÇÃO DE PRATA COLOIDE E 3) AGREGAÇÃO E FORMAÇÃO DAS AGNPs ATRAVÉS DO AGENTE REDUTOR.	21
FIGURA 4. POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO ANTIMICROBIANA DAS AGNPs EXTRAÍDO DE (ZHAO ET AL., 2018).	26
FIGURA 5. ESPETRO DE ABSORÇÃO DAS AGNPs (A, B E C, OBTIDAS PELOS MÉTODOS A, B, E C, RESPETIVAMENTE).....	30

Índice de Tabelas

TABELA 1. RESUMO DE BACTÉRIAS COM CAPACIDADE DE SINTETIZAR AGNPs, TAMANHOS, FORMAS E LOCAIS DE SÍNTESE. RETIRADO DE (SIDDIQI, HUSEN, & RAO, 2018).	23
TABELA 2. RESUMO DE ALGUNS EXEMPLOS DE PLANTAS COM CAPACIDADE DE SÍNTESE DE AGNPs, BASEADO ESTUDO PUBLICADO POR PATIL E COLABORADORES (PATIL & KIM, 2017).	24
TABELA 3. VALORES DE TAMANHOS MÉDIOS, PDI E POTENCIAL ZETA DAS AGNPs RECORRENDO A DIFERENTES METODOLOGIAS (MÉDIA $\pm$ DESVIO PADRÃO APENAS PARA O TAMANHO).	30
TABELA 4. HALOS DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS PARA AS AGNPs PREPARADAS SEGUNDO CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS A, B E C E À CONCENTRAÇÃO DE 1 MG/ML.	31
TABELA 5. HALOS DE INIBIÇÃO EM MILÍMETROS PARA AS AGNPs PREPARADAS SEGUNDO CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS A, B E C E À CONCENTRAÇÃO DE 10 MG/ML.	32

1. Introdução

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as doenças infecciosas continuam a ser uma das principais causas de morte, sobretudo devido ao uso excessivo e incontrolado de antibióticos, à falta de cuidados de saúde e de desenvolvimento de novos fármacos (Bassetti et al., 2015; WHO, 2014).

A resistência bacteriana a antibióticos tornou-se num grande impedimento para tratamentos bem-sucedidos. Como resultado, a infeção bacteriana continua a ser uma das principais causas de morbilidade e mortalidade nos dias de hoje (Tang & Zheng, 2018).

Por isso, têm sido realizados vários esforços na investigação e desenvolvimento de fármacos ou de sistemas de veiculação de fármacos recorrendo às novas tecnologias como, por exemplo, a nanotecnologia. Neste campo, as nanopartículas de metais são as mais usadas devido à sua variedade de forma, tamanho, propriedades físicas, químicas e óticas (Lee & Jun, 2019).

De um modo geral, a grande vantagem da nanotecnologia está relacionada com uma ligação superficial entre as nanopartículas (NPs) com a bactéria e de libertação de iões, seguida pela produção de elevadas quantidades de espécies reativas de oxigénio (ERO) (Wang, Hu, & Shao, 2017). Com este modo de ação, torna-se difícil para as células bacterianas desenvolverem mutações genéticas e resistirem ao tratamento (Tang & Zheng, 2018). Em particular, a combinação destas NPs com a prata tem ganho bastante relevo como um potente agente antibacteriano, devido ao seu largo espetro de ação e eficácia (Burduşel et al., 2018; Wang et al., 2017). Estas AgNPs são únicas e podem alterar consideravelmente as propriedades físicas, químicas e biológicas devido à sua relação superfície-volume (X. F. Zhang, Liu, Shen, & Gurunathan, 2016).

2. A prata e a nanotecnologia: enquadramento histórico e utilizações

2.1 Elemento químico – a prata

A prata (Ag) é um elemento químico inorgânico pertencente à família dos metais de transição. Na tabela periódica, localiza-se no grupo 11 e no período 5, tendo como número atómico 47, massa atómica de 107,87 g/mol, ponto de fusão de 961,78 °C e ponto de ebulição de 2161,8 °C.

Este elemento químico possui uma cor prateada brilhante, é dúctil, maleável e possui ainda elevada condutividade térmica e eléctrica (De Souza, Rodrigues, Silva, & Guerra, 2013; Firdhouse & Lalitha, 2015).

Conhecida pelo Homem desde a pré-história, pensa-se que a prata metálica seja conhecida pelos Caldeus desde o ano 4000 a.C., sendo o terceiro metal conhecido após o ouro e o cobre (Alexander, Wesley, 2009; De Souza *et al.*, 2013). Existem diversas associações históricas que remontam há antiguidade. Há evidências do uso de nitrato de prata na farmacopeia romana. Existem várias associações históricas com os seres humanos desde Hipócrates, pai da Medicina que promoveu o uso da prata para desinfetar feridas, até Alexandre, o Grande, que foi aconselhado por Aristóteles a armazenar água em vasos de prata e fervê-la antes de usar. No final do século XVIII, Credé, um obstetra alemão, popularizou o uso da solução profilática ocular de nitrato de prata a 1%, na oftalmia neonatal. Naquele tempo, os recém-nascidos enfrentavam diversas doenças infecciosas nas maternidades, entre estas, uma das mais comuns era a conjuntivite (Tsunechiro, 1979). Durante meados do século XIX, Joseph Lister e Marion Sims promoveram o uso de fios de prata cirúrgica para reduzir a incidência de infeções (Macintyre, 2019; Manikprabhu & Li, 2015).

Atualmente, esta é essencialmente utilizada numa vertente tópica, em pensos compostos por gaze não aderente com prata na composição de forma a que existir um tratamento anti traumático de feridas e controlo da infeção e bactericida. (Macintyre, 2019; Manikprabhu & Li, 2015).

Embora não seja muito abundante, a prata pode ser encontrada na sua forma elementar e combinada em alguns minerais, como a argentita. Assim, a prata pode ser extraída através de complexos solúveis a partir dos seus minérios. No entanto, a maior parte é

obtida como subproduto da exploração de metais como o cobre, o zinco e o chumbo. Quimicamente, a prata é um elemento muito estável, mas quando combinada com outros elementos exibe um estado de oxidação de +1, como é o caso do cloreto de prata (AgCl) e do nitrato de prata (AgNO₃). Já o caso do fluoreto de prata (II) (AgF₂), apresenta um raro estado de oxidação de +2 e é solúvel assim como o nitrato de prata (De Souza *et al.*, 2013).

Os compostos de prata têm uma dose letal média (DL₅₀) elevada, ou seja, uma toxicidade baixa em relação aos outros metais pesados. Tal deve-se ao facto desta ser pouco absorvida quando ingerida, sendo que por via oral a DL₅₀ é maior que 5000 mg/kg, por via cutânea maior que 2000 mg/kg e por via inalatória é de 5,16 mg/m³ (“DrugBank,” 2016). No entanto, os sais como o AgNO₃ e o AgF₂ por serem cáusticos, podendo provocar danos nos tecidos. Além do mais, grandes quantidades de prata e dos seus compostos podem ser absorvidos pelo sistema circulatório e depositados em vários tecidos, originando uma argíria (Molina-Hernandez, Diaz-Gonzalez, Saeb-Lima, & Dominguez-Cherit, 2015). Apesar desta patologia ser bastante rara, revela-se como uma pigmentação azul-acinzentada na pele, olhos e/ou mucosas, provocando uma desfiguração de permanente. Formas leves de argíria por vezes são confundidas com cianose (Hadrup, Sharma, & Loeschner, 2018). A maioria dos relatos de argíria generalizada está relacionada à ingestão coloidal de prata (Molina-Hernandez *et al.*, 2015).

2.2 A Nanotecnologia

A Nanotecnologia tem sido vastamente estudada e cada vez mais utilizada para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas mais eficientes e seguras. Esta área envolve vários campos da engenharia de sistemas funcionais à nano escala, e pode ainda ser descrita como um conjunto de métodos e técnicas de processamento de materiais onde resultarão novos produtos com propriedades físico-químicas especiais.

O termo “nano” deriva da palavra em grego *nanos* que significa anão. Este termo refere-se a um parâmetro de medida de 10⁻⁹ m de unidades do sistema internacional, ou seja, a bilionésima parte do metro. Do ponto de vista físico, a *US Food and Drug Administration* (FDA) também se refere às NPs como materiais que apresentam uma dimensão entre 1 a 100 nm e exibem fenómenos dependentes da dimensão

(Jeevanandam, Barhoum, Chan, Dufresne, & Danquah, 2018; Patil & Kim, 2017). Porém, biologicamente, essa definição acresce até aos 1000 nm. síntese e o uso de nanopartículas remonta à antiguidade, embora se possa especular que o seu uso foi puramente accidental. A primeira evidência da sua aplicação foi há cerca de 2000 anos, na Índia, através de uma mistura de nanopartículas de ouro misturadas em mel ou *ghee* de vaca. Esta era administrada oralmente para tratar doenças do sistema respiratório, inflamatórias e do sistema nervoso (Arvizo *et al.*, 2012) Mais tarde, foram ainda encontradas evidências da sua utilização por artesões, no processo de criação de vitrais e outras obras de arte (Arvizo *et al.*, 2012).

No caso da nanotecnologia, os primeiros colaboradores da área foram James Clark Maxwell (físico e matemático escocês, 1831-1879) e Richard Adolf Zsigmondy (químico austríaco-alemão, 1865-1929). Maxwell imaginou um dispositivo do tamanho de um átomo – conhecido como Demónio de Maxwell – que poderia capturar moléculas à medida que elas se moviam numa direção específica. Zsigmondy estudou coloides (misturas químicas onde uma substância é dispersa uniformemente por outra) e analisou partículas de ouro e outros nanomateriais. Outros colaboradores importantes, na primeira metade do século vinte incluíram Irvin Langmuir (químico e físico americano, 1881-1957) e Katherine B. Blodgett (física americana, 1898-1910), a primeira mulher a obter um doutoramento de Física na Universidade de Cambridge.

A ideia e o conceito de nanotecnologia tiveram o início formal numa palestra da Sociedade de Física Americana intitulada de *There's Plenty of Room at the Bottom*, pelo físico Richard Feynman, que decorreu no Instituto de Tecnologia da Califórnia, no dia 29 de dezembro de 1959 (Feynman, 1992; Webster, 2007). Aqui, Feynman discutiu a importância de manipular e controlar objetos em pequena escala, e descreveu como os fenómenos físicos mudam a sua manifestação dependendo do tamanho (Feynman, 1992).

Décadas depois, em 1974, Norio Taniguchi estabeleceu o termo nanotecnologia através das suas investigações de ultra precisão (Webster, 2007). Ele usou o termo para descrever processos semicondutores, e considerou a nanotecnologia como uma tecnologia de fabrico com elevada precisão (Zarzycki, 2014).

A evolução da nanotecnologia permitiu ainda a melhor utilização de agentes ativos para cosméticos, prevenção e tratamento de doenças. É conhecido que as nanopartículas oferecem inúmeras vantagens devido à sua capacidade de veicular fármacos, tornando-os com melhores características, tais como mais solúveis, com uma melhor capacidade

de permear membranas, e melhorar a sua afinidade a recetores celulares, aumentando a biodisponibilidades, fazendo ainda que essa ação decorra com menos efeitos secundários (Mota, Rijo, Molpeceres, & Reis, 2017).

As NPs são úteis não só na área farmacêutica, mas também em kits de diagnóstico e tratamento de águas, e na produção de sensores e/ou baterias (Saklani & Jain, 2012). Em áreas como a produção alimentar, as NPs são utilizadas não só na produção, embalagem e armazenamento devido às suas propriedades físico-químicas, mas também para detetar contaminantes moleculares, microrganismos, gases ou em algumas aplicações ambientais (na compostagem de resíduos agrícolas e de esgoto e na aceleração do crescimento de sementes de arroz) (Cuddy & Upitis, 2002; Gupta, Agarwal, & Pradhan, 2018; Koedrith et al., 2015; Lihua Zhang et al., 2017).

2.3 Nanopartículas de prata e os seus métodos de síntese

Numa visão alargada, as AgNPs podem ser sintetizadas através de diferentes métodos, que serão abordados neste subcapítulo. Tal como se pode observar pela Figura 1 seguinte, os métodos podem ser resumidamente classificados como: métodos *top-down* e de *bottom-up*. No primeiro, as partículas são sintetizadas a partir do fracionamento de um metal (por métodos físicos como ablação a laser, decomposição termal, pirólise por *spray* ultrassónico, evaporação e/ou condensação) (De Matteis, Cascione, Toma, & Leporatti, 2018; Rudramurthy *et al.*, 2016); nos métodos *bottom-up*, as partículas são obtidas por materiais e reagentes ao nível atómico, através de métodos químicos ou biológicos (Rudramurthy *et al.*, 2016). Está descrito na literatura que as NPs obtidas podem ter uma grande variabilidade de tamanho e forma. No entanto, tem-se verificado que estas NPs produzidas usando abordagens *bottom-up* têm muito potencial em diversas aplicações biológicas e os métodos envolvem processos de emulsificação, precipitação ou por *self-assembly* (Fu *et al.*, 2018).

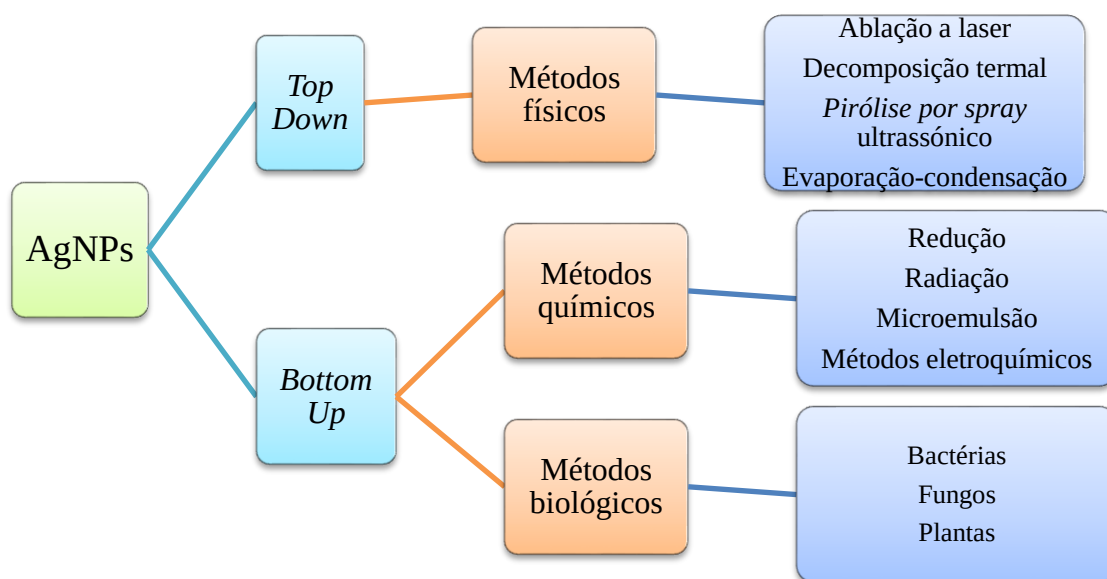


Figura 1. Esquema dos métodos de *top-down* e *bottom-up* usados na preparação de AgNPs

2.3.1 *Top-down*: Métodos físicos

Neste processo são utilizadas ferramentas controladas por parâmetros experimentais externos, de modo a criar estruturas à nano escala, com as formas e características desejadas (Biswas *et al.*, 2012). No entanto, esses processos geralmente requerem instrumentos altamente sofisticados, produtos químicos e aquecimento, além do alto consumo de energia, o que leva a um elevado custo operacional (Khandel, Yadaw, Soni, Kanwar, & Shahi, 2018).

Dentro dos métodos físicos para a produção de AgNPs, neste subcapítulo irão ser abordados os métodos mais usuais para a produção das AgNPs tais como ablação a laser, decomposição termal, pirólise por *spray* ultrassônico e evaporação-condensação. A ablação a laser do material macroscópico de prata é um método promissor para a obtenção de partículas coloides de prata puras (Korbekandi & Iravani, 2012). Estas são obtidas pela incidência de um feixe de laser que funciona como fonte de energia e induz a ablação do material sólido. A prata macroscópica organiza-se em aglomerados no meio ambiente (gás ou líquido), como representado Figura 2. As partículas sintetizadas a partir deste método têm dimensões que variam entre os 30 e os 40 nm, que depende do solvente, do comprimento de onda, da intensidade e do tempo do feixe de laser.

Sabe-se que o tamanho das partículas aumenta de forma linear com a potência utilizada (De Matteis *et al.*, 2018).

Uma das grandes vantagens em utilizar este método reside na ausência de possíveis contaminações por solventes (comum em métodos de produção química), o que origina partículas mais uniformes em relação ao tamanho (Iravani, Korbekandi, Mirmohammadi, & Zolfaghari, 2014; Korbekandi & Iravani, 2012; Van Bortel, Struijker-Boudier, & Safar, 2001).

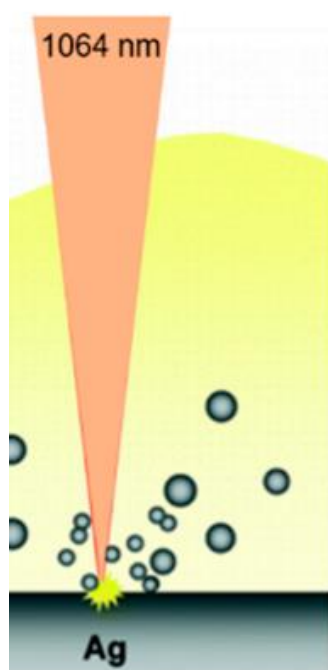


Figura 2. Representação ilustrativa da ablação a laser com um feixe incidente e a ablação da prata para a formação de AgNPs, extraído de (De Matteis *et al.*, 2018).

No processo de decomposição termal ocorre uma reação química endotérmica. O método permite decompor moléculas de grandes dimensões em partículas de menor tamanho, num ambiente restrito de oxigénio. Esta decomposição pode ser realizada através da utilização de uma solução de nitrato de prata (AgNO_3) e oleato de sódio. O tamanho das partículas através deste método varia entre os 0,7 e os 9,5 nm, dependendo da temperatura utilizada (De Matteis *et al.*, 2018).

A pirólise por *spray* ultrassónico permite a obtenção de AgNPs com um tamanho controlado. Isto deve-se ao facto de o processo ser realizado por um aerossol, a partir de uma solução aquosa de um sal de prata. A pirólise por pulverização utiliza um

aparelho ultrassônico a 600 °C, e o azoto como gás transportador ou, então, ar atmosférico a uma temperatura acima dos 900 °C. Este método geralmente forma partículas puras, monodispersas, com dimensões entre 20 e os 300 nm (De Matteis *et al.*, 2018).

Por último, a evaporação/condensação é um dos métodos físicos mais comuns de síntese de AgNPs, por ser uma técnica fácil e direta. Utiliza um forno tubular, à pressão atmosférica, onde é colocado material que contém a prata e submetidos a um gás. Apesar de ser relativamente simples, este método tem algumas limitações tais como: o elevado consumo de energia enquanto aumenta a temperatura do meio em torno do material de origem, o elevado tempo de espera para atingir a estabilidade térmica e o espaço que todos os aparelhos necessitam (De Matteis *et al.*, 2018; Iravani *et al.*, 2014).

2.3.2 Bottom-up: Métodos químicos

Os métodos químicos são considerados os mais comuns na síntese de AgNPs. Geralmente usam agentes redutores orgânicos ou inorgânicos e agentes estabilizadores não biodegradáveis (Bonnia *et al.*, 2016; Mota *et al.*, 2017). Apesar de gerar partículas de formas e tamanhos muito variáveis, estes métodos têm a grande vantagem de sintetizarem muitas NPs num curto intervalo de tempo (Ahmed, Ahmad, Swami, & Ikram, 2016).

Dentro dos tipos de produção aqui referidos, a abordagem química mais utilizada é o método por redução, pois permite a síntese de AgNPs em solução aquosa ou em solventes orgânicos. Além do mais, permite a síntese na presença de precursores metálicos, agentes redutores (como o citrato de sódio ou o borohidreto de sódio), hidrogénio molecular, dimetilformamida (DMF), polímeros de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) e polietilenoglicol (PLGA-PEG-PLGA) e agentes estabilizadores (como o álcool vinílico, polivinilpirrolidona (PVP) ou PEG) (Korbekandi & Iravani, 2012). A redução dos sais de prata induz a formação de soluções coloides durante duas etapas: nucleação e o crescimento. Estas vão influenciar a forma e o tamanho das NPs. As etapas são controladas pelo pH, temperatura e agentes estabilizadores. Na literatura está ainda descrita a relação inversamente proporcional entre o pH e o diâmetro das AgNPs (Guzmán, Dille, & Godet, 2009).

Ainda no âmbito dos métodos *bottom-up*, a síntese de NPs pode ser feita por radiação γ ou UV. A produção através da radiação gama é realizada aplicando uma radiação direta sobre a solução aquosa de um sal de prata. Durante este processo, ocorre a indução de ionização e excitação da solução sob atmosfera de gás de hidrogénio reduzindo assim os iões de prata. Simultaneamente há a formação radicais hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$) que oxidam as partículas e vão também reagir com o hidrogénio, formando átomos de hidrogénio que contribuem para a redução dos iões de prata. Com a oxidação em simultâneo das partículas de prata e a redução dos iões de prata é possível obter um tamanho gradual; os defeitos estruturais são reduzidos e conseguem-se obter NPs com diâmetro médio de 7 nm (Prucek, Kvitek, & Hrbac, 2004). Neste método, as AgNPs são sintetizadas através da incidência da radiação por meio de uma lâmpada de descarga de mercúrio. A solução reacional para além do sal de prata (como o AgNO_3), contém 2-propanol, acetona e um estabilizador polimérico, como o polieterimida (PEI). A incidência da radiação na acetona e a subsequente captação de átomos de hidrogénio do 2-propanol geram radicais com elevada potência redutora que reagem com o sal de prata, formando as AgNPs.

Existe ainda outro método de produção por radiação UV que envolve gelatina como estabilizador e um meio com iões de prata (Darroudi, Ahmad, Abdullah, & Ibrahim, 2011). Após radiação, as partículas reduzem-se em tamanhos inferiores e são estabilizadas pelos grupos amina existentes no esqueleto da gelatina, conduzindo assim à formação de AgNPs (Darroudi, Ahmad, Abdullah, *et al.*, 2011; Korbekandi & Iravani, 2012). De salientar que, neste método ocorre a decomposição da água pela radiação ionizante, proporcionando uma via para reduzir os iões metálicos Ag^+ . Assim, ao usar este método, as soluções expostas à radiação e os iões solvatados produzidos, conseguem reduzir os iões de prata até átomos de prata de modo a formar as NPs, que são estabilizadas pela gelatina (Darroudi, Ahmad, Abdullah, *et al.*, 2011). A distribuição do tamanho médio destas AgNPs é de 20 nm (Darroudi, Ahmad, Zak, Zamiri, & Hakimi, 2011).

Na técnica de microemulsão é possível obter NPs uniformes e de tamanho controlado (Korbekandi & Iravani, 2012). Este método baseia-se em três precursores: i) fase polar, geralmente a água; ii) fase apolar como um óleo ou um hidrocarboneto líquido; e iii) um tensioativo. A interface gerada entre os dois líquidos imiscíveis separados pelo tensioativo, e a intensidade do transporte dos agregados metálicos (mediada por sais de amónio quaternários) entre as duas fases, são os dois principais fatores que afetam as

interações entre o metal e os agentes redutores (Korbekandi & Iravani, 2012). As NPs formadas podem ter um tamanho médio entre os 50 e os 1000 nm (Severino *et al.*, 2012).

As emulsões criadas poderão ser de O/A ou A/O, dependendo do tensioativo usado, permitindo a obtenção de NPs monodispersas e estáveis usando as duas microemulsões: uma, cujo núcleo contém água e AgNO_3 , e o outro de água com hidrato de hidrazina como agente redutor. A escolha dos precursores depende do produto final pretendido, sendo que uma reação tem início na adição do solvente da fase oleosa (por exemplo: o dodecano permite uma menor perda de AgNPs no transporte entre fases) e do tensioativo (como o dioctilsulfosucinato de sódio) (De Matteis *et al.*, 2018; Korbekandi & Iravani, 2012).

Uma clara vantagem na utilização do método de microemulsão para a produção de AgNPs, como complexos veiculadores de metais ou fármacos, é a sua baixa citotoxicidade devido à sua semelhança estrutural com a dos sistemas fisiológicos, sendo geralmente reconhecidos como seguros para administração oral e tópica (Severino *et al.*, 2012).

O método eletroquímico para produção de AgNPs permite um maior controlo no tamanho das mesmas, através de modificações nos parâmetros de eletrólise e melhorando a monodispersividade, que altera as composições das soluções eletrolíticas (Iravani *et al.*, 2014). Este método recorre a etanol, água desionizada ou a monómeros orgânicos ou polímeros. Esta redução através de polímeros permite melhorar o controlo da forma e do tamanho (Roldán, Pellegrini, & de Sanctis, 2013). Durante a síntese das NPs, uma célula galvânica é mantida num banho de ultrassons com a intensidade de corrente constante, onde irá existir uma competição entre os processos à superfície, a formação das NPs e a deposição de prata no cátodo (Cheon, Lee, Song, & Kim, 2011). Para que a síntese possa ocorrer em meio aquoso, forçam-se as partículas tal como representado na Figura 3 (Khaydarov, Khaydarov, Gapurova, Estrin, & Scheper, 2009). Na síntese com PEG obtém-se partículas estáveis que permitem a difusão de pequenas moléculas. O PEG atua como agente estabilizador e influencia os processos no eletrodo onde ocorre a oxidação, e neste caso a maior parte da prata reduzida é posteriormente oxidada. Os iões de prata reduzidos são divididos, sendo que uma parte se deposita na superfície do eletrodo, enquanto os outros são reduzidos a NPs e estabilizados (Kajbafvala, Li, Bahmanpour, Maneshian, & Kauffmann, 2013). Existe, ainda, outro método eletroquímico de síntese de NPs, onde um cátodo é rotativo e as NPs são mais

eficazmente transferidas para a solução, evitando assim a existência de aglomerados e assegurando a monodispersão das mesmas (De Matteis *et al.*, 2018; Iravani *et al.*, 2014).

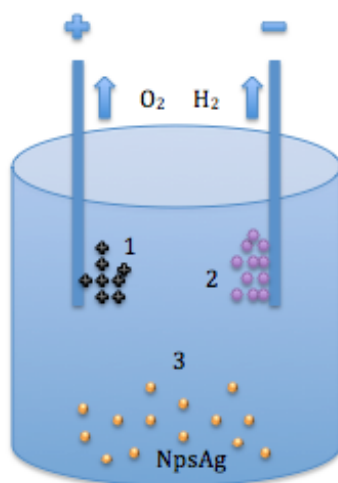


Figura 3. Representação do método eletroquímico para a produção de AgNPs, usando um ânodo e cátodo de Ag. 1) Deposição de prata oxidada no estado de oxidação +1; 2) Formação de prata colóide e 3) Agregação e formação das AgNPs através do agente redutor.

2.3.3 *Bottom-up*: Métodos biológicos

Outra forma de sintetizar NPs metálicas, que tem ganho especial atenção nos últimos anos, são os métodos biológicos (Khandel *et al.*, 2018). Nesta abordagem, a biossíntese de AgNPs envolve principalmente reações de redução/oxidação, isto é, a partir de enzimas, grupos funcionais, proteínas ou metabolitos, cujas propriedades são antioxidantes, redutoras ou estabilizadoras (De Matteis *et al.*, 2018; Sabri, Umer, Awan, Hassan, & Hasnain, 2016).

A comunidade científica têm vindo a apostar neste tipo de síntese, também conhecida por síntese verde por ser bastante ecológica, económica, mais segura e menos tóxica devido ao facto de serem utilizadas fontes naturais (Ahmad, Bhatnagar, Ali, & Dutta, 2015; De Matteis *et al.*, 2018; Rudramurthy *et al.*, 2016).

As fontes de reagentes naturais podem ser divididas em três categorias: microrganismos (bactérias e fungos); plantas e extratos vegetais; e membranas e ADN de vírus e

diatomáceas (De Matteis *et al.*, 2018). No entanto, nesta dissertação apenas serão abordados os métodos de produção de AgNPs por bactérias, fungos e plantas.

Os microrganismos tais como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas stutzeri*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Fusarium oxysporum*, *Agaricus bisporus*, *Penicillium citrinum*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus terreus* têm a capacidade de produzir NPs de forma natural como parte do seu metabolismo e, portanto, podem ser utilizados para várias aplicações (Saklani & Jain, 2012; Shahzad *et al.*, 2019). Na síntese a partir de culturas bacterianas Gram-positivas ou Gram-negativas, a produção de AgNPs pode ocorrer intra-, extracelularmente ou em ambos os locais (Singh *et al.*, 2015). O controle de tamanho e forma pode ser alcançado através de vários parâmetros, como pH, tempo de exposição e temperatura da reação (Krishnamurthy & Yun, 2013). Na síntese intracelular ocorre a transferência de íons metálicos para o interior do microrganismo, enquanto que na síntese extracelular os íons metálicos permanecem à superfície (De Matteis *et al.*, 2018).

Na síntese extracelular de AgNPs, uma vez que ocorre no exterior da célula, é possível produzir NPs de várias formas, como esféricas, triangulares, hexagonais, cuboides (Siddiqi, Husen, & Rao, 2018). Uma vantagem nesta técnica é a facilidade de isolamento das NPs sendo feito normalmente por centrifugação e posteriormente é ressuspenso em um solvente (Singh, Shedbalkar, Wadhwani, & Chopade, 2015).

Na síntese intracelular, sabe-se que a redução dos íons metálicos necessária para formar NPs é uma das estratégias de sobrevivência de bactérias resistentes a antibióticos (Lin, Lok, & Che, 2014). Assim, para que ocorra a produção de AgNPs é adicionado ao meio de cultura bacteriana um sal de prata, e os microrganismos são incubados em condições ideais ao seu crescimento. Neste processo, a recuperação das AgNPs é mais complexa, uma vez que se encontram aprisionadas no meio intra-celular e conseguir obtê-las sem toda a biomassa é o maior desafio. Alguns estudos já têm vindo a indicar como pode ser feito este isolamento e purificação das AgNPs, através do uso de surfactantes iónicos como o brometo de cetrimónio (CTAB) ou dodecil sulfato de sódio (SDS) e posterior centrifugação ou sedimentação (Krishnamurthy & Yun, 2013; Singh, Shedbalkar, Wadhwani, & Chopade, 2015).

Na Tabela 1 seguinte, encontram-se alguns exemplos de bactérias que podem ser utilizadas para as diferentes sínteses.

Tabela 1. Resumo de bactérias com capacidade de sintetizar NPsAg, tamanhos, formas e locais de síntese. Retirado de (Siddiqi, Husen, & Rao, 2018).

Bactérias	Tamanho / Forma das AgNPs	Local de síntese
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8-12 nm / Esférica	Extracelular
<i>Enterobacter aerogenes</i>	25-35 nm /Esférica	Extracelular
<i>Aeromonas sp.</i>	6,4 nm (forma não determinada)	Extracelular e intracelular
<i>Bacillus cereus</i>	4-5 nm /Esférica	Intracelular
<i>Bacillus flexus</i>	12 e 56 nm / Esféricas e triangulares	Extracelular
<i>Enterococcus faecalis</i>	10-80 nm (forma não determinada)	Extracelular
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	93 nm / Cuboidal	Extracelular
<i>Lactobacillus mindensis</i>	2-20 nm / Esférica	Extracelular

Outro método que também tem sido vastamente investigado é o da biossíntese de AgNPs a partir de fungos patogênicos ou não patogênicos. Por possuírem maior quantidade de proteínas e enzimas, os fungos contribuem para uma alta produtividade e estabilidade das partículas (De Matteis et al., 2018; Siddiqi, Husen, & Rao, 2018; Zhao et al., 2018). Neste processo, a síntese pode também ser intra- ou extracelular, e tal como as bactérias, alguns destes também têm a capacidade de produção nos dois locais em simultâneo (Zhao et al., 2018). Alguns estudos relatam a síntese de AgNPs através de biomassa derivada de *Aspergillus flavus* para a obtenção de NPs esféricas, ou através do *Penicillium fellutanum*, cujo enzima nitrato redutase numa cultura filtrada, tem a capacidade de reduzir os íons de prata (Ovais et al., 2018). O fungo *Aspergillus niger* foi também utilizado para reduzir AgNPs através da combinação do enzima redutase e do quinino, induzindo assim uma transferência de elétrons no meio extracelular (De Matteis et al., 2018; Zhao et al., 2018).

No caso da síntese de NPs através de plantas, o método é geralmente menos tóxico, rápido e mais económico, além de não requer condições assépticas e manutenção da cultura celular (De Matteis et al., 2018; Skandalis et al., 2017). Por outro lado, ao utilizar material vegetal para sintetizar NPs, facilmente se adapta a produção para a larga escala (Iravani et al., 2014). Na síntese de NPs usando extratos vegetais, o extrato da planta é simplesmente misturado com a solução aquosa do sal metálico à temperatura ambiente, para que esses processos possam ser considerados como uma abordagem de síntese verde (Khandel et al., 2018). Para que ocorra a biossíntese, ocorre uma redução

bioquímica do ião prata, que é efetuada por biomoléculas naturalmente presentes como saponinas, proteínas, taninos, aminopolissacáridos, enzimas, alcalóides, vitaminas, entre outros (Bonnia *et al.*, 2016; De Matteis *et al.*, 2018). As variações de morfologia e de tamanho das AgNPs são da responsabilidade da composição e concentração desses mesmos extratos, pH, temperatura, concentração dos sais metálicos e tempo de reação (Patil & Kim, 2017).

Os extratos podem ser obtidos a partir de diferentes partes das plantas como as folhas, os caules, raízes, rebentos, flores, cascas, sementes e frutos (Lakshmanan, Sathiyaseelan, Kalaichelvan, & Murugesan, 2018; Siddiqi *et al.*, 2018). Na Tabela 2 encontra-se representado um resumo de algumas plantas que têm a capacidade de produzir AgNPs a partir de um extrato (em água, álcool ou metanol), juntamente com as dimensões e morfologias descritas na literatura.

Tabela 2. Resumo de alguns exemplos de plantas com capacidade de síntese de AgNPs, baseado estudo publicado por Patil e colaboradores (Patil & Kim, 2017).

Planta	Tamanho (nm) / Forma	Agente redutor
<i>Anisomeles indica</i>	50-100 / Esférica	Extrato aquoso das folhas
<i>Azadirachta indica</i>	34 / Esférica	Extrato aquoso das folhas
<i>Bergenia ciliata</i>	35 / Esférica	Extrato metanólico da planta
<i>Coffea arábica</i>	20-30 / Polimórficas	Extrato alcoólico das sementes
<i>Curculigo orchioides</i>	15-18 / Esférica	Extrato aquoso dos rizomas
<i>Coleus forskohlii</i>	5-15 / Esférica	Extrato aquoso das raízes
<i>Dioscorea alata</i>	10-20 / Esférica	Extrato aquoso dos tubérculos
<i>Rhuis chinensis</i>	150 / Triangulares e hexagonais	Extrato aquoso dos galhos
<i>Salvinia molesta</i>	5-15 / Esféricas	Extrato aquoso das folhas
<i>Terminalia arjuna</i>	3-50 / Esféricas e irregulares	Extrato aquoso das folhas
<i>Terminalia cuneata</i>	25-50 / Esféricas	Extrato aquoso da casca
<i>Tinospora cordifolia</i>	30 / Esféricas	Extrato aquoso das folhas
<i>Vigna radiata</i>	5-30 / Esféricas	Extrato aquoso das sementes

2.4 Prata, nanotecnologia e microbiologia

Devido ao surto e o aumento da resistência de microrganismos a inúmeros antibióticos, houve um aumento de desenvolvimento de produtos antissépticos à base de prata (Khalandi *et al.*, 2017) graças ao seu efeito antibacteriano eficaz e tem sido amplamente estudado (Qing *et al.*, 2018). Em alguns estudos verificou-se que as atividades antibacterianas de ampicilina, canamicina, eritromicina e cloranfenicol foram aumentadas com as AgNPs (Moghaddam *et al.*, 2015). De acordo com dados publicados em 2013, os microrganismos mais comuns em infecções e resistência bacteriana são a *S. aureus* (Gram-positiva) e a *E. coli* (Gram-negativa) (Xu *et al.*, 2013) e, neste caso, as AgNPs devido às suas propriedades antimicrobianas têm sido utilizadas para impedir a contaminação dos alimentos tanto de bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (Zhao *et al.*, 2018). O mecanismo de ação não é totalmente conhecido, mas pensa-se que esteja relacionado com a ligação e a penetração das AgNPs à parede celular devido à atração eletrostática entre a carga negativa das membranas celulares e a carga positiva das partículas (Shahzad *et al.*, 2019). Deste modo, as AgNPs inativam os grupos tiol da parede celular e causando lise celular e liberação de potássio no citoplasma, tal como pode ser observado na Figura 4 (Khalandi *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018). Em comparação com bactérias Gram-negativas, as bactérias Gram-positivas são mais resistentes às AgNPs devido à presença de peptidoglicanos na parede celular que a tornam mais espessa (Tang & Zheng, 2018). Por exemplo, a *S. aureus* sendo uma bactéria Gram-positiva, possui uma camada de peptidoglicano, com aproximadamente 30 nm, que pode efetivamente impedir a entrada das NPs (Tang & Zheng, 2018).

Acredita-se ainda que as AgNPs exibem várias propriedades úteis, incluindo excelente estabilidade química (Liao, Li, & Tjong, 2019).

Além disso, as AgNPs têm um enorme potencial em terapias antimicrobianas, anti-inflamatórias antiparasitárias, antivirais (HIV), antioxidantes, antidiabéticas e doenças oncológicas (Firdhouse & Lalitha, 2015; Lakshmanan *et al.*, 2018; Mitra, Das, Sen, & Mahanty, 2018; Zhao *et al.*, 2018).

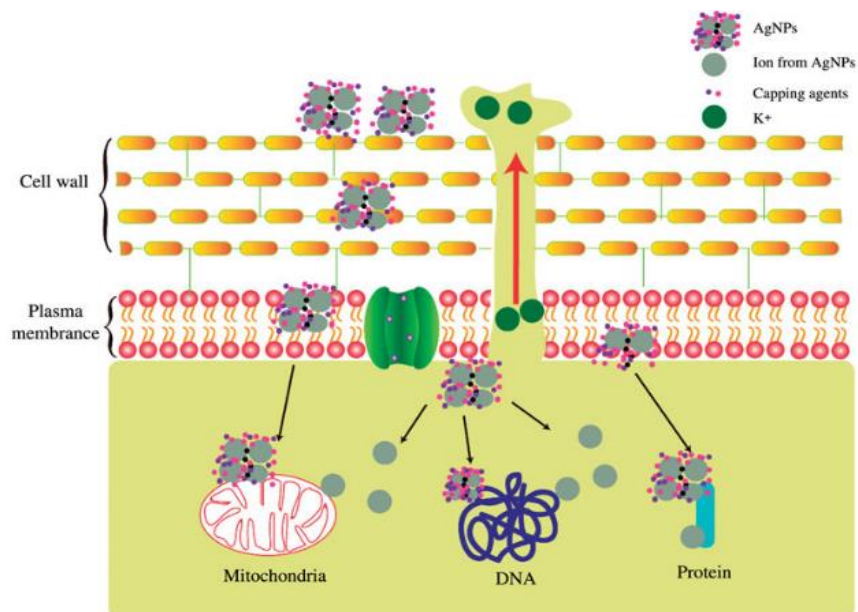


Figura 4. Possível mecanismo de ação antimicrobiana das AgNPs extraído de (Zhao *et al.*, 2018).

Nesta dissertação pretende-se avaliar de que forma diferentes condições experimentais do mesmo método de produção das NPs podem influenciar as propriedades das AgNPs, tais como a sua caracterização espectrofotométrica, tamanhos, índice de polidispersividade (PDI), potencial zeta e a atividade antimicrobiana da prata encapsulada.

3. Trabalho de Campo

3.1 Materiais e métodos

3.1.1 Materiais

O nitrato de prata e o borohidreto de sódio foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha). Os microrganismos usados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Todos os reagentes e solventes utilizados apresentavam pureza analítica.

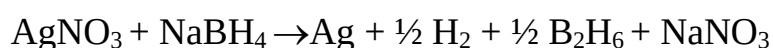
3.1.2 Métodos

3.1.2.1 Preparação de AgNPs – Método Bottom up

O trabalho experimental decorreu durante um período de 6 meses, onde foram testadas diferentes condições experimentais do método de preparação de AgNPs.

As AgNPs foram preparadas pelo método de redução química com NaBH₄ a 2 mM. A solução aquosa de AgNO₃ numa concentração de 1 mM foi adicionada gota-a-gota sobre a solução aquosa de NaBH₄ a 400 rpm.

A reação química do nitrato de prata com NaBH₄ está representada na reação seguinte (Mulfinger *et al.*, 2007).



A mudança de cor para amarelo claro é indicativa da formação das AgNPs. Para a preparação das AgNPs foram realizadas três condições experimentais diferentes:

Método A: Banho de gelo

A solução aquosa de NaBH₄ foi colocada no congelador por 20 minutos. Posteriormente, a solução aquosa de AgNO₃ foi adicionada gota-a-gota (à velocidade de 1 gota/segundo), sempre com agitação constante. A solução de NaBH₄ quando

colocada no Erlenmeyer, foi protegida da luz, para que ocorresse a formação das NPs (Mulfinger *et al.*, 2007).

Método B: Solução aquosa NaBH₄ aquecida

Neste método, a solução aquosa de NaBH₄ (45 mL) foi submetido a aquecimento durante 30 minutos a 60 °C. A solução aquosa de AgNO₃ (15 mL) foi adicionada gota a gota com agitação e sem luz incidente. Após a adição completa, a mistura continuou em agitação lenta de 100 rpm por mais 20 minutos a uma temperatura de 90 °C, e foi ajustado o pH a 10,5 com NaOH 1M seguindo estudos anteriores (Agnihotri, Mukherji, & Mukherji, 2014).

Método C: Solução de AgNO₃ aquecida

Neste método, solução aquosa de AgNO₃ foi aquecida até à ebulição e adicionada cuidadosamente, gota-a-gota, à solução aquosa de NaBH₄ que estava em agitação vigorosa de 400 rpm. Após o final da adição, a mistura ficou em agitação durante mais 10 minutos com rpm (David *et al.*, 2014).

3.1.2.2 Caracterização das AgNPs

A caracterização das AgNPs produzidas foi realizada por espectroscopia de absorção UV-Visível (Evolution 300, Hertfordshire, Inglaterra) através de varrimento num intervalo de comprimento de onda 200-600 nm.

As NPs foram caracterizadas pelo seu tamanho médio/ índice de polidispersão (PDI) e carga superficial (potencial zeta) através de espectroscopia de fotões e mobilidade electroforética, respetivamente, no equipamento DelsaTMNano C (BeckmanCoulter, California, EUA).

Os lotes de AgNPs produzidos foram conservados a uma temperatura entre 2-8 °C, de forma a preservar a estabilidade próprias NPs. Em alternativa, alguns desses lotes foram posteriormente liofilizados durante 24 h no liofilizador (Labconco, Kansas, EUA).

3.1.2.3 Ensaios *in vitro*

Para testar a eficácia da atividade antimicrobiana das AgNPs recorreu-se a placas de Petri com meio Mueller-Hinton para bactérias *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli*. (ATCC 25922) segundo estudos anteriores (Kora & Rastogi, 2013). Resumidamente, as suspensões bacterianas foram cultivadas sobre a superfície da placa de Petri recorrendo-se a uma zaragatoa estéril. Posteriormente, os poços foram feitos no agar com aproximadamente 5 mm de diâmetro através de uma pipeta de Pasteur. Em seguida, foi adicionado a cada poço 50 µL de amostra em concentrações diferentes (1 mg/mL e 10 mg/mL), bem como os respetivos controlos positivos (vancomicina e ampicilina) e negativo (solvente de dissolução, DMSO). As placas foram incubadas durante 24 h a 37 °C numa incubadora (Memmert, Heidolph Inkubator 1000). No caso do microrganismo *S. aureus*, o controlo positivo utilizado foi a vancomicina. No caso do microrganismo *E. coli* foi utilizado a ampicilina.

Após esse período, os diâmetros das zonas de inibição foram medidos, em milímetros. Todos os ensaios foram realizados sob condições de assépticas e em duplicado.

3.2 Resultados e discussão

3.2.1 Caracterização das AgNPs

Por espectrofotometria, as AgNPs apresentaram um comprimento de onda de máxima absorção próximo dos 400 nm, conforme apresentado na Figura 5A, 5B e 5C. Este pico encontra-se assim conforme com os valores da literatura descrita, que prevê para uma morfologia esférica, um pico de absorção entre os 420 – 450 nm (Agnihotri et al., 2014; Lu, Rong, Li, Yang, & Chen, 2013).

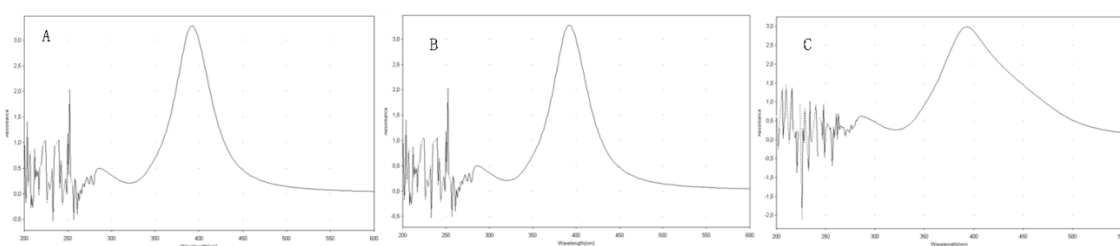


Figura 5. Espectro de absorção das AgNPs (A, B e C, obtidas pelos métodos A, B, e C, respectivamente).

Seguidamente, foram obtidos os valores das propriedades físicas das AgNPs produzidas, através da caracterização do tamanho, índice de polidispersividade (PDI) e potencial zeta encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de tamanhos médios, PDI e potencial zeta das AgNPs recorrendo a diferentes metodologias (média $\pm$ desvio padrão apenas para o tamanho).

Método	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão (PDI)	Potencial Zeta (mV)
A	8,4 $\pm$ 5,7	0,290	-15,64
B	13,7 $\pm$ 10,0	0,357	-29,13
C	2,8 $\pm$ 2,0	0,383	-25,35

As AgNPs apresentaram um tamanho concordante com estudos anteriores (Allahverdiyev, Kon, Abamor, Bagirova, & Rafailovich, 2011; Ma *et al.*, 2011). A dimensão das NPs é um fator crucial para a sua absorção. Supõe-se que o tamanho da partícula deverá ser inferior a 40 nm para que ocorra uma permeação cutânea, principalmente através dos anexos cutâneos como por exemplo, os folículos pilosos

(Prow et al., 2011). Além disso, é igualmente desejável que as AgNPs sejam uniformes entre si, isto porque, diferentes tamanhos conduzirão a absorções diferentes (Taket *al.* 2015). As NPs obtidas a partir do método C (AgNO₃ aquecido à ebulição) apresentaram menores dimensões e foram as que se apresentaram menos monodispersas.

No que diz respeito ao PDI e ao potencial zeta estes apresentaram resultados concordantes com a literatura (Salvioni et al., 2017).

3.2.2 Testes de eficácia *in vitro* das AgNPs

No teste da eficácia da atividade antibacteriana das AgNPs, este revelou resultados bastante promissores como apresentado nas tabelas seguintes (Tabela 4 e Tabela 5), principalmente no caso das bactérias Gram-negativas (*E. coli*).

Tabela 4. Resultados dos halos de inibição, em milímetros, para as AgNPs preparadas segundo condições experimentais A, B e C e à concentração de 1 mg/mL.

Halos inibição (mm)		
AgNPs	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
A	10	13
B	10	12,5
C	5	5
Controlo positivo	20	10
Controlo negativo	5	5

Tabela 5. Resultados dos halos de inibição, em milímetros, para as AgNPs preparadas segundo condições experimentais A, B e C e à concentração de 10 mg/mL.

Halos inibição (mm)		
AgNPs	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)
A	10,5	13
B	11,5	14,5
C	6	9
Controlo positivo	20	10
Controlo negativo	5	5

Estes estudos de eficácia *in vitro* demonstraram uma atividade antibacteriana para AgNPs sintetizadas por todos os métodos. Porém, ficou demonstrado que o método B teve melhores resultados na atividade antimicrobiana.

4. Discussão

A nanotecnologia representa uma abordagem moderna e inovadora para desenvolver e testar novas formulações com propriedades antimicrobianas, nas quais as nanopartículas de prata são o destaque. Características das AgNPs, como a forma e o tamanho, são importantes não só para aumentar a atividade antimicrobiana, mas também para reduzir a sua citotoxicidade (Verma & Maheshwari, 2019).

Com este trabalho foi possível produzir nanopartículas de prata utilizando três métodos diferentes de preparação. Todas as AgNPs produzidas foram caracterizadas relativamente às suas propriedades físicas e à atividade antimicrobiana, contra duas bactérias, uma Gram-positiva (*S. aureus*) e uma Gram-negativa (*E. coli*).

Numa primeira abordagem, foi efetuada a caracterização espectrofotométrica das AgNPs onde se identificou um pico de absorção máxima próximo dos 400 nm, o que está de acordo com os dados bibliográficos, nas quais as AgNPs esféricas possuem comprimento de onda de máxima absorção entre os 420 e os 450 nm (Lu et al., 2013; Verkhovskii et al., 2019).

Uma vez que a atividade antibacteriana das AgNPs contra a *E. coli* e *S. aureus* é dependente do seu tamanho, verificou-se que os resultados obtidos na caracterização física dos métodos A, B e C se encontravam concordantes com a literatura, uma vez que os tamanhos obtidos foram inferiores a 40 nm (Agnihotri et al., 2014; Lu et al., 2013). Sabe-se que nanopartículas de tamanho inferior a 4 nm podem penetrar e permear a pele intacta, entre os 4 e 20 nm pode permear a pele intacta e danificada, entre 21 e 45 nm pode penetrar e permear apenas a pele danificada e superior a 45 nm não pode penetrar nem permear a pele (Larese Filon, Mauro, Adami, Bovenzi, & Crosera, 2015). Assim sendo, facilmente as nanopartículas produzidas podem atravessar a barreira da pele para o tratamento de infeções cutâneas (Prow et al., 2011). Por outro lado, vários estudos relataram que as AgNPs de menor tamanho garantem um maior efeito bactericida, devido à facilidade de entrada na célula e à facilidade de interação com a área superficial de contacto da bactéria (razão entre a superfície livre e a massa) (Lu et al., 2013; Li Zhang, Wu, Si, & Shu, 2018).

De acordo com algumas informações na literatura, uma condição essencial para melhorar a eficácia antibacteriana dos AgNPs é ter uma carga positiva na superfície das partículas (Salvioni et al., 2017). Deste modo, os resultados obtidos no potencial zeta

das AgNPs produzidas pelos três métodos estudados, seriam contraditórios. No entanto, as AgNPs catiónicas são mais citotóxicas do que aquelas com carga superficial neutra ou negativa (Fröhlich, 2012; Xiao et al., 2011). Este dado vem a indicar que o efeito contra as bactérias em estudo, tem menor probabilidade de estar associado à elevada toxicidade das AgNPs produzidas, sendo por isso, especificamente antibacterianos. É também, uma vantagem para futuras aplicações em infecções cutâneas, devido à melhor difusão de NPs de carga negativa para a derme e para a camada inferior dos folículos capilares, muito mais rapidamente (Ogiso, Yamaguchi, Iwaki, Tanino, & Miyake, 2001).

Nos testes microbiológicos de halos de inibição contra as bactérias *E.coli* (Gram-negativa) e *S.aureus* (Gram-positiva), os resultados sugeriram que a produção de AgNPs mais eficaz biologicamente foi obtida através do método B. De acordo com a dependência da atividade antibacteriana com o tamanho, os resultados estão concordante com o descrito na literatura, onde é referido que as AgNPs com tamanhos entre os 5 e 7 nm são as que apresentam geralmente melhores halos de inibição (Agnihotri et al., 2014). De um modo geral, as AgNPs produzidas pelos métodos A, B e C neste estudo revelaram uma elevada atividade antimicrobiana contra a bactéria *E. coli* que, pela ausência da camada de peptidoglicano exterior, se pressupõe que as AgNPs tenham tido maior eficácia, em comparação com a atividade registada contra *S. aureus*. Por outro lado, uma explicação plausível para a atividade antibacteriana registada, reside no potencial redox favorável dos átomos de Ag^0 na superfície das AgNPs, que desencadeia a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigénio (EROs,) traduzindo-se na elevada atividade antimicrobiana observada (Salvioni et al., 2017).

A baixa atividade antimicrobiana contra a *S. aureus* poderá também estar associada ao elevado nível de polidispersividade associado à aglomeração das NPs durante a sua produção. Neste sentido, a adição de um agente estabilizador como o oleato de sódio, poderia melhorar a atividade biológica em estudo (Verkhovskii et al., 2019).

Em suma, apesar dos resultados obtidos, será necessário continuar a investigação sobre este tema, uma vez que as condições experimentais foram estudadas, mas ainda não estão otimizadas.

5. Conclusão e Perspetivas futuras

Neste trabalho foram produzidos três tipos de AgNPs e avaliadas as suas atividades biológicas *in vitro* contra a Gram-positiva *S. aureus* e a Gram-negativa *E. coli*. Os resultados sugerem o borohidreto de sódio aquecido (método B) como o melhor método de síntese de AgNPs por ter apresentado os valores mais elevados nos halos de inibição. De modo, na otimização dos métodos de preparação de AgNPs é necessário dar prosseguimento a esta investigação, avaliando a sua segurança e eficácia em outros modelos celulares.

6. Referências bibliográficas

- Agnihotri, S., Mukherji, S., & Mukherji, S. (2014). Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. *RSC Adv.*, 4(8), 3974–3983. <https://doi.org/10.1039/C3RA44507K>
- Ahmad, N., Bhatnagar, S., Ali, S. S., & Dutta, R. (2015). Phytofabrication of bioinduced silver nanoparticles for biomedical applications. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 7019–7030. <https://doi.org/10.2147/IJN.S94479>
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research*, 7, 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>
- Alexander, Wesley, J. (2009). History of the medical use of silver. *Surgical Infections*, 10(3), 289–294. <https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941>
- Allahverdiyev, A. M., Kon, K. V., Abamor, E. S., Bagirova, M., & Rafailovich, M. (2011). Coping with antibiotic resistance: combining nanoparticles with antibiotics and other antimicrobial agents. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(11), 1035–1052. <https://doi.org/10.1586/eri.11.121>
- Arvizo, R. R., Bhattacharyya, S., Kudgus, R. A., Giri, K., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2012). Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: Past, present and future. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2943–2970. <https://doi.org/10.1039/c2cs15355f>
- Bassetti, M., De Waele, J. J., Eggimann, P., Garnacho-Montero, J., Kahlmeter, G., Menichetti, F., ... Poulakou, G. (2015). Preventive and therapeutic strategies in critically ill patients with highly resistant bacteria. *Intensive Care Medicine*. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00134-015-3719-z>
- Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E., & Faupel, F. (2012). Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: techniques,

- applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*, 170(1–2), 2–27. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.11.001>
- Bonnia, N. N., Kamaruddin, M. S., Nawawi, M. H., Ratim, S., Azlina, H. N., & Ali, E. S. (2016). Green Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using “Polygonum Hydropiper” and Study its Catalytic Degradation of Methylene Blue. *Procedia Chemistry*, 19, 594–602. <https://doi.org/10.1016/J.PROCHE.2016.03.058>
- Burduşel, A. C., Gherasim, O., Grumezescu, A. M., Mogoantă, L., Ficai, A., & Andronesu, E. (2018). Biomedical applications of silver nanoparticles: An up-to-date overview. *Nanomaterials*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nano8090681>
- Cheon, J. M., Lee, J. H., Song, Y., & Kim, J. (2011). Synthesis of Ag nanoparticles using an electrolysis method and application to inkjet printing. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 389(1–3), 175–179. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.08.032>
- Cuddy, L., & Uptis, R. (2002). Aural perception. In R. Colwell & C. Richardson (Eds.), *The new handbook of research on music teaching and learning : a project of the Music Educators National Conference* (pp. 333–343). New York: Oxford University Press.
- Darroudi, M., Ahmad, M. Bin, Abdullah, A. H., & Ibrahim, N. A. (2011). Green synthesis and characterization of gelatin-based and sugar-reduced silver nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 6(1), 569–574. <https://doi.org/10.2147/IJN.S16867>
- Darroudi, M., Ahmad, M. B., Zak, A. K., Zamiri, R., & Hakimi, M. (2011). Fabrication and characterization of gelatin stabilized silver nanoparticles under UV-Light. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), 6346–6356. <https://doi.org/10.3390/ijms12096346>
- David, L., Moldavan, B., Vulcu, A., Olenic, L., Perde-Schrepler, M., Fischer-Fodor, E., ... Filip, G. A. (2014). Green synthesis, characterization and anti-inflammatory activity of silver nanoparticles using European black elderberry fruits extract. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.

- De Matteis, V., Cascione, M., Toma, C., & Leporatti, S. (2018). Silver Nanoparticles: Synthetic Routes, In Vitro Toxicity and Theranostic Applications for Cancer Disease. *Nanomaterials*, 8(5), 319. <https://doi.org/10.3390/nano8050319>
- De Souza, G. D., Rodrigues, M. A., Silva, P. P., & Guerra, W. (2013). Prata: Breve histórico, propriedades e aplicações. *Educacion Quimica*, 24(1), 14–16. [https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)73189-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)73189-6)
- DrugBank. (2016).
- Feynman, R. P. (1992). There's Plenty of Room at the Bottom. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 1(1), 60–66.
- Firdhouse, M. J., & Lalitha, P. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. *Journal of Nanotechnology*, 2015(September 2014). <https://doi.org/10.1155/2015/829526>
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>
- Fu, X., Cai, J., Zhang, X., Li, W.-D., Ge, H., & Hu, Y. (2018). Top-down fabrication of shape-controlled, monodisperse nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 169–187. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.07.006>
- Gupta, S. D., Agarwal, A., & Pradhan, S. (2018). Phytostimulatory effect of silver nanoparticles (AgNPs) on rice seedling growth: An insight from antioxidative enzyme activities and gene expression patterns. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 624–633. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.023>
- Guzmán, M. G. M., Dille, J., & Godet, S. (2009). Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method and their antibacterial activity. *Proceedings of World Academy of Science: Engineering & Technology*, 45, 357–364. <https://doi.org/10.1007/s11814-010-0067-0>
- Hadrup, N., Sharma, A. K., & Loeschner, K. (2018). Toxicity of silver ions, metallic

- silver, and silver nanoparticle materials after in vivo dermal and mucosal surface exposure: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 98, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.007>
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, S. V, & Zolfaghari, B. (2014). Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., Dufresne, A., & Danquah, M. K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*. Beilstein-Institut Zur Forderung der Chemischen Wissenschaften. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Kajbafvala, A., Li, M., Bahmanpour, H., Maneshian, M. H., & Kauffmann, A. (2013). Nano/Microstructured Materials: Rapid, Low-Cost and Eco-Friendly Synthesis Methods. *Journal of Nanoparticles*, 2013.
- Khalandi, B., Asadi, N., Milani, M., Davaran, S., Abadi, A. J. N., Abasi, E., & Akbarzadeh, A. (2017). A Review on Potential Role of Silver Nanoparticles and Possible Mechanisms of their Actions on Bacteria. *Drug Research*. Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/s-0042-113383>
- Khandel, P., Yadaw, R. K., Soni, D. K., Kanwar, L., & Shahi, S. K. (2018). Biogenesis of metal nanoparticles and their pharmacological applications: present status and application prospects. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 8(3), 217–254. <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0267-4>
- Khaydarov, R. A., Khaydarov, R. R., Gapurova, O., Estrin, Y., & Scheper, T. (2009). Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(5), 1193–1200. <https://doi.org/10.1007/s11051-008-9513-x>
- Koedrith, P., Thasiphu, T., Weon, J. Il, Boonprasert, R., Tuitemwong, K., & Tuitemwong, P. (2015). Recent trends in rapid environmental monitoring of pathogens and toxicants: Potential of nanoparticle-based biosensor and applications. *Scientific World Journal*. Hindawi Limited.

<https://doi.org/10.1155/2015/510982>

- Kora, A. J., & Rastogi, L. (2013). Enhancement of antibacterial activity of capped silver nanoparticles in combination with antibiotics, on model gram-negative and gram-positive bacteria. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/871097>
- Korbekandi, H., & Iravani, S. (2012). Silver Nanoparticles. In A. A. Hashim (Ed.), *The delivery of nanoparticles* (pp. 4–36). Croatia: InTech. Retrieved from www.intechopen.com
- Krishnamurthy, S., & Yun, Y. S. (2013). Recovery of microbially synthesized gold nanoparticles using sodium citrate and detergents. *Chemical Engineering Journal*, 214, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.10.028>
- Lakshmanan, G., Sathiyaseelan, A., Kalaichelvan, P. T., & Murugesan, K. (2018). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles using fruit extract of *Cleome viscosa* L.: Assessment of their antibacterial and anticancer activity. *Karbala International Journal of Modern Science*, 4(1), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.kijoms.2017.10.007>
- Larese Filon, F., Mauro, M., Adami, G., Bovenzi, M., & Crosera, M. (2015). Nanoparticles skin absorption: New aspects for a safety profile evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.05.005>
- Lee, S. H., & Jun, B. H. (2019). Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
- Liao, C., Li, Y., & Tjong, S. C. (2019). Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20020449>
- Lu, Z., Rong, K., Li, J., Yang, H., & Chen, R. (2013). Size-dependent antibacterial activities of silver nanoparticles against oral anaerobic pathogenic bacteria. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(6), 1465–1471.

<https://doi.org/10.1007/s10856-013-4894-5>

- Ma, A., Hm, K., Aa, K., Malik, A., Sultan, A., Shahid, M., ... Azam, A. (2011). Evaluation of antibacterial activity of silver nanoparticles against MSSA and MRSA on isolates from skin infections. *Research Article Biology and Medicine*, 3(2), 141–146.
- Macintyre, I. (2019). A pioneer in two worlds: Thomas Keith (1827-1895) photographer and surgeon. *Journal of Medical Biography*, 27(2), 115–122. <https://doi.org/10.1177/0967772017702320>
- Manikprabhu, D., & Li, W. (2015). Microbe-mediated synthesis of silver nanoparticles - A new drug of choice against pathogenic microorganisms. In *Antimicrobials: Synthetic and Natural* (pp. 389–401).
- Mitra, S., Das, A., Sen, S., & Mahanty, B. (2018). Potential of metabolic engineering in bacterial nanosilver synthesis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 0. <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2522-8>
- Moghaddam, A. B., Namvar, F., Moniri, M., Tahir, P. M., Azizi, S., & Mohamad, R. (2015). Nanoparticles biosynthesized by fungi and yeast: A review of their preparation, properties, and medical applications. *Molecules*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules200916540>
- Molina-Hernandez, A., Diaz-Gonzalez, J., Saeb-Lima, M., & Dominguez-Cherit, J. (2015). Argyria after silver nitrate intake: Case report and brief review of literature. *Indian Journal of Dermatology*, 60(5), 520. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.164427>
- Mota, A. H., Rijo, P., Molpeceres, J., & Reis, C. P. (2017). Broad overview of engineering of functional nanosystems for skin delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 532(2), 710–728. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.07.078>
- Mulfinger, L., Solomon, S. D., Bahadory, M., Jeyarajasingam, A. V., Rutkowsky, S. a., & Boritz, C. (2007). Synthesis and Study of Silver Nanoparticles. *Journal of Chemical Education*, 84(2), 322–325. <https://doi.org/10.1021/ed084p322>

- Ogiso, T., Yamaguchi, T., Iwaki, M., Tanino, T., & Miyake, Y. (2001). Effect of positively and negatively charged liposomes on skin permeation of drugs. *Journal of Drug Targeting*, 9(1), 49–59. <https://doi.org/10.3109/10611860108995632>
- Ovais, M., Khalil, A. T., Ayaz, M., Ahmad, I., Nethi, S. K., & Mukherjee, S. (2018). Biosynthesis of metal nanoparticles via microbial enzymes: A mechanistic approach. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19124100>
- Patil, M. P., & Kim, G. Do. (2017). Eco-friendly approach for nanoparticles synthesis and mechanism behind antibacterial activity of silver and anticancer activity of gold nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 79–92. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8012-8>
- Prow, T. W., Grice, J. E., Lin, L. L., Faye, R., Butler, M., Becker, W., ... Roberts, M. S. (2011). Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.01.012>
- Prucek, R., Kvitek, L., & Hrbac, J. (2004). Silver Colloids - Methods of Preparation and Utilization. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis Facultas Rerum Naturalium, CHEMICA* 43, 3–12.
- Qing, Y., Cheng, L., Li, R., Liu, G., Zhang, Y., Tang, X., ... Qin, Y. (2018). Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S165125>
- Roldán, M. V., Pellegrini, N., & de Sanctis, O. (2013). Electrochemical Method for Ag-PEG Nanoparticles Synthesis. *Journal of Nanoparticles*, 2013, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2013/524150>
- Rudramurthy, G., Swamy, M., Sinniah, U., Ghasemzadeh, A., Rudramurthy, G. R., Swamy, M. K., ... Ghasemzadeh, A. (2016). Nanoparticles: Alternatives Against Drug-Resistant Pathogenic Microbes. *Molecules*, 21(7), 836. <https://doi.org/10.3390/molecules21070836>
- Sabri, M. A., Umer, A., Awan, G. H., Hassan, M. F., & Hasnain, A. (2016). Selection

- of Suitable Biological Method for the Synthesis of Silver Nanoparticles. *Nanomaterials and Nanotechnology*, 6, 29. <https://doi.org/10.5772/62644>
- Saklani, V., & Jain, V. K. (2012). Biotechnology & Biomaterials Microbial Synthesis of Silver Nanoparticles : A Review. *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, (13), 1–3. <https://doi.org/10.4172/2155-952X.S13-007>
- Salvioni, L., Galbiati, E., Collico, V., Alessio, G., Avvakumova, S., Corsi, F., ... Colombo, M. (2017). Negatively charged silver nanoparticles with potent antibacterial activity and reduced toxicity for pharmaceutical preparations. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 2517–2530. <https://doi.org/10.2147/IJN.S127799>
- Severino, P., Andreani, T., Macedo, A. S., Fanguiero, J. F., Santana, M. H. a, Silva, A. M., & Souto, E. B. (2012). Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. *Journal of Drug Delivery*, 2012, 750891. <https://doi.org/10.1155/2012/750891>
- Shahzad, A., Saeed, H., Iqtedar, M., Hussain, S. Z., Kaleem, A., Abdullah, R., ... Chaudhary, A. (2019). Size-Controlled Production of Silver Nanoparticles by *Aspergillus fumigatus* BTCB10: Likely Antibacterial and Cytotoxic Effects. *Journal of Nanomaterials*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5168698>
- Siddiqi, K. S., Husen, A., & Rao, R. A. K. (2018). A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>
- Singh, R., Shedbalkar, U. U., Wadhwani, S. A., & Chopade, B. A. (2015). Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(11), 4579–4593. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6622-1>
- Skandalis, N., Dimopoulou, A., Georgopoulou, A., Gallios, N., Papadopoulos, D., Tsipas, D., ... Chatzinikolaidou, M. (2017). The Effect of Silver Nanoparticles Size, Produced Using Plant Extract from *Arbutus unedo*, on Their Antibacterial Efficacy. *Nanomaterials*, 7(7), 178. <https://doi.org/10.3390/nano7070178>

- Tak, Y. K., Pal, S., Naoghare, P. K., Rangasamy, S., & Song, J. M. (2015). Shape-Dependent Skin Penetration of Silver Nanoparticles: Does It Really Matter? *Scientific Reports*, 5, 16908. <https://doi.org/10.1038/srep16908>
- Tang, S., & Zheng, J. (2018). Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles: Structural Effects. *Advanced Healthcare Materials*. Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701503>
- Tsunechiro, Maria Alice. (1979). REVISÃO BIBLIOGRÁFICA SOBRE A PROFILAXIA DA CONJUNTIVITE GONOCÓCICA NO RECÉM-NASCIDO. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, 13(3), 275-286. <https://doi.org/10.1590/0080-6234197901300300275>
- Van Bortel, L. M., Struijker-Boudier, H. A., & Safar, M. E. (2001). Pulse pressure, arterial stiffness, and drug treatment of hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 38(4), 914–921. <https://doi.org/10.11648/j.ijmsa.20150405.17>
- Verkhovskii, R., Kozlova, A., Atkin, V., Kamyshinsky, R., Shulgina, T., & Nechaeva, O. (2019). Physical properties and cytotoxicity of silver nanoparticles under different polymeric stabilizers. *Heliyon*, 5(3). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01305>
- Verma, P., & Maheshwari, S. K. (2019). *Applications of Silver nanoparticles in diverse sectors*. *Int. J. Nano Dimens* (Vol. 10).
- Wang, L., Hu, C., & Shao, L. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*. Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
- Webster, T. J. (2007). International Journal of Nanomedicine: Editorial Foreword. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 2(1), 1–2. <https://doi.org/10.1111/j.1754-8845.1988.tb00250.x>
- WHO. (2014). *ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance*.
- Xiao, K., Li, Y., Luo, J., Lee, J. S., Xiao, W., Gonik, A. M., ... Lam, K. S. (2011). The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholeic acid based

- micellar nanoparticles. *Biomaterials*, 32(13), 3435–3446.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.021>
- Xu, S., Wang, H., Cheng, M., Hu, J., Wang, C., & Han, C. C. (2013). Preparation and optimization of silver nanoparticles embedded electrospun membrane for implant associated infections prevention. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 5(21), 11014–11021. <https://doi.org/10.1021/am403250t>
- Zarzycki, A. (2014). *Editorial At source of nanotechnology* (Vol. 17).
- Zhang, Li, Wu, L., Si, Y., & Shu, K. (2018). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. *PLoS ONE*, 13(12).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209020>
- Zhang, Lihua, Zeng, G., Dong, H., Chen, Y., Zhang, J., Yan, M., ... Huang, Z. (2017). The impact of silver nanoparticles on the co-composting of sewage sludge and agricultural waste: Evolutions of organic matter and nitrogen. *Bioresource Technology*, 230, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.01.032>
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
- Zhao, X., Zhou, L., Riaz Rajoka, M. S., Yan, L., Jiang, C., Shao, D., ... Jin, M. (2018). Fungal silver nanoparticles: synthesis, application and challenges. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 817–835.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1414141>